

医療機関に由来する排水高度処理へのオゾンの応用

Application of Ozone based Wastewater Treatment of Hospital Effluent

○東 剛志*、臼井 優**、林 哲也***

* : 大阪医科薬科大学, ** : 酪農学園大学, *** : 相愛大学

論文要旨

抗菌薬に耐性を有する薬剤耐性菌の出現と蔓延の問題が、世界的な規模で進行している。水環境から検出される薬剤耐性菌の起源は多岐に渡るとされているが、環境中に流入する排水の影響を考慮することの重要性が指摘されている。しかしながら、環境を対象とした薬剤耐性菌については不明なことも多く、病院等の医療機関に由来する排水を対象とした研究事例については、未だに知見が限られているのが現状である。そこで、本研究では医療機関における排水にオゾン処理を適応し、高度処理の有効性について評価を試みた。

The emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) is an ongoing problem on a global scale. Although the origins of AMR detected in the aquatic environment have been reported to be diverse, the importance of considering the impact of wastewater has been highlighted. However, there is still limited knowledge about researches involving wastewater from medical facilities. This study applied ozone treatment to hospital wastewater and evaluate the effectiveness of advanced wastewater treatment.

キーワード：病院排水、オゾン処理、薬剤耐性 (AMR)

1. はじめに

近年、抗菌薬に耐性を有する薬剤耐性菌（以下薬剤耐性菌）の出現と蔓延の問題が、世界的な規模で進行している。抗菌薬は人、畜産業、水産業、農業、愛玩動物など幅広い分野で用いられており、薬剤耐性菌が直接的に人に感染する健康リスクにとどまらず、環境を経由して最終的に人に感染する間接的なリスクについても考慮することの重要性が指摘されている^{1,2)}。英国政府の委託を受けた O'Neill 委員会は、薬剤耐性菌の蔓延に有効な対策が講じられない場合、薬剤耐性菌による世界での年間死亡者は 2014 年時点の 70 万人から 2050 年には 1,000 万人となりがんによる死者を上回り（国際的に著名な医学術雑誌として知られる The Lancet (2021 年の Impact Factor : 203) に掲載されている最新の報告によると、2019 年には 127 万人に増加しているとされる³⁾）、世界 GDP への経済損失は 100 兆ドルにのぼると推定している⁴⁾。薬剤耐性菌の問題は各国が直面する課題となっており、WHO は各国に国家行動計画の策定を求めており⁵⁾、日本においてもアクションプランが制定され対策が進んでいる⁶⁾。

これまでの研究により、病院等の医療機関に由来する排水中には、患者に由来する種々の微生物や、感染症の治療に関連する抗菌薬が含まれていることが報告されている⁷⁾。そのため、医療排水中に存在する薬剤耐性菌や医薬品類の環境へのインパクトの評価を行うとともに、これらの環境汚染物質を削減又は低減可能な処理法開発を模索していくことは、人や環境の健康を守ることにとどまらず、院内感染の低減や医療の質の向上にも寄与出来る可能性があることが報告されつつある⁸⁾。しかしながら、病院等の医療機関に由来する排水を対象とした研究事例については、世界的にみても知見が限られているのが現状である。そこで、本研究では病院から公共下水道に放流される排水処理へのオゾンの応用について検討を試みた。

2. 実験方法

2.1 薬剤耐性菌

研究対象とする薬剤耐性菌は、WHO が対策を求めている複数の抗菌薬に耐性を有する多剤薬剤耐性菌⁵⁾のうち、緊急度が高い又は動向に注意を要するとされている Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE), Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*, Multi-drug-resistant *Acinetobacter* (MDRA), Multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRP), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) と、これらの耐性菌を構成する微生物種 (*Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) について検討を行った。

2.2 抗菌薬

本研究では、2.1 で述べた薬剤耐性菌に対応する抗菌薬に加え、これまでに下水及び河川水中からの検出例が国内外で多く報告されている代表的な抗菌薬と、国内での生産量や販売高及び未変化体での体外排泄割合を基に医療現場で主に使用されていると考えられる抗菌薬⁹⁾をあわせた 7 成分 (ampicillin, cefdinir, ciprofloxacin, clarithromycin, levofloxacin, minocycline, vancomycin) を対象とした。

2.3 オゾン処理実験

オゾン処理による水試料中に存在する薬剤耐性菌への不活化効果の評価は、ラボスケールでの半回分水処理装置を用いて行った。水試料は、反応槽の外部に設置されたウォータージャケット内に恒温水循環装置を用いて水を循環させることで 20°C に維持し、反応槽の下部からスターラーで溶液を攪拌させながら除去実験を行った。処理条件については、国内の下水処理場でオゾン処理が導入されている施設における処理条件や既報^{10,11)}を基に、オゾン濃度 6.5 mg/L で流速 0.3 L/min の注入率で行い、経時的に水試料を採取した。また、オゾン処理に過酸化水素や UV を併用する系では、254 nm の UV ランプ (照射強度 2.8 mW/cm²)、過酸化水素の添加濃度は 5 mg/L の条件で処理を行った⁸⁾。採取した水試料には、チオ硫酸ナトリウムの添加を行った後、2.4 の方法により水試料中に存在する薬剤耐性菌の解析を行った。

2.4 薬剤耐性菌の測定方法

薬剤耐性菌及びその他の微生物の測定は、病院等の臨床現場において薬剤耐性菌の判別に用いられており、排水や河川等の環境領域においても用いられている、抗菌薬を含有する、又は無添加による特定酵素基質培地法を基にした方法^{12,13)}により行った。培養条件については、既報¹³⁾を基に各々の寒天培地に検体を塗抹した後 37°C 又は 42°C の好気条件で 24 時間培養し、培養後発色基質との反応により呈色したコロニー数を計測した。また、qPCR を用いた各種水試料中に存在する薬剤耐性遺伝子 (*bla_{IMP}* (CRE), *bla_{TE}* 及び *bla_{CTX-M}* (ESBL)) の測定と、微生物の菌叢解析¹⁴⁾についてもあわせて行った。

2.5 抗菌薬の測定方法

排水試料中の抗菌薬の測定は、既報をもとにガラス繊維ろ紙 (GF/B : 1 μ m) で吸引ろ過し、Oasis HLB 固相抽出カートリッジに通水させて固相抽出を行った。固相抽出後、メタノール及びアセトンを用いて抗菌薬の溶出を行い、窒素ガスで穏やかに濃縮乾固後、ギ酸・メタノール混合溶液に再溶解させ、UPLC-MS/MS (Waters) を用いて測定を行った¹⁵⁾。

3. 結果および考察

ラボスケールでの病院排水のオゾン処理実験における、薬剤耐性菌に対する経時的な不活化効果の推移をまとめたものを図 1 に示す。対象とした全ての薬剤耐性菌に対してオゾン処理による不活化効果が確認された。

不活化効果の速度は、各種薬剤耐性菌毎に異なる傾向がみられたが、いずれの耐性菌についてもオゾン処理により速やかに不活化され、処理開始から 10 分後にはいずれの処理系においても薬剤耐性菌の不活化率が 95%以上となった。また、オゾン単独による処理 (O_3) と比較して、過酸化水素の添加を行う処理 (O_3/H_2O_2) では概ね同等の不活化効果となる傾向がみられたが、UV を併用する系 (O_3/UV , O_3UV/H_2O_2) において不活化率が向上し、処理開始から 2 分後に不活化率が 99%以上に達した。これらの結果は、病院排水の処理にオゾンベースとした処理が有効であることを示唆している。

下水処理場の排水と比較して、不活化に必要な処理時間は長くなる傾向があるものの、ろ過や生物学的な前処理を行わず、夾雑物が多く含まれる病院排水に直接的なオゾン処理を行うことが可能であることは、興味深い知見であると考えられる。

次に、上記したオゾン処理実験において、処理前 (0 分) と処理後 (30 分) の水試料について薬剤耐性遺伝子の解析を行った結果を図 2 に示す。得られた結果より、オゾン処理を行うことで排水中に存在する薬剤耐性遺伝子についても除去効果がみられた。薬剤耐性遺伝子の除去において、除去率は O_3 :19%、 O_3/H_2O_2 :34%、 O_3/UV :91%、 O_3UV/H_2O_2 :86% と、薬剤耐性菌と同様に UV を併用する系において処理効果の向上がみられた。さらに、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析においても細菌種のクラスターが処理前と比較して約 40%~60%程度に減少する傾向がみられ、処理に伴い多くの遺伝子の構造に変化が生じていると考えられた。詳細についてはさらなる検討を行う必要があると考えられるが、微生物に対する消毒・不活化効果の有効性について検討を試みる上で、遺伝子を含めた除去の効果について、高度処理を行うことで効果の高い処理が行うことが可能であることを示唆していると考えられる。

病院排水中の抗菌薬へのオゾン処理による経時的な除去効果の推移を図 3 に示す。オゾン単独の処理 (O_3) では、処理後 30 分後に試料中から検出される成分 (Vancomycin) がみられるが、 O_3/H_2O_2 処理では処理開始から 10 分後に除去率が 84%、 O_3/UV 、 O_3UV/H_2O_2 処理では 92%、94%と大部分の抗菌薬が除去され、20 分の処理で除去率が 99%以上となった。抗菌薬に対するオゾン処理の除去速度は、薬剤耐性菌の不活化速度よりも若干小さくなる傾向がみられることは、薬剤耐性菌と抗菌薬の両方について効果の高い処理を行う上で重要な知見であると考えられる。

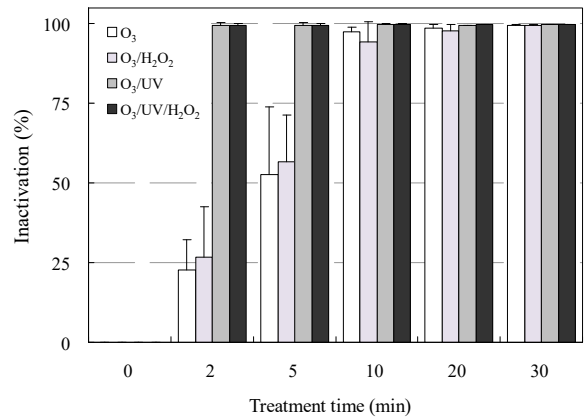


図 1 オゾン処理による薬剤耐性菌 (合計) の不活化の推移

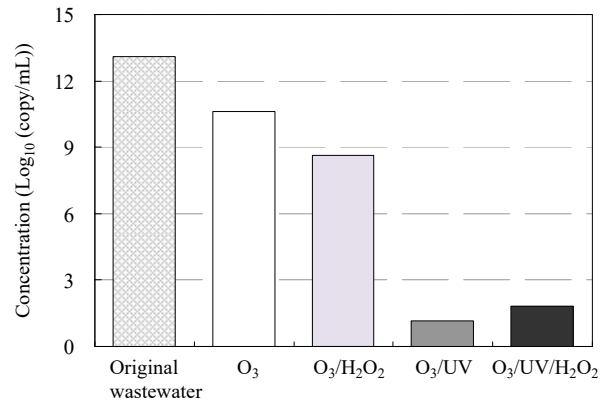


図 2 オゾン処理前後の医療排水中における薬剤耐性遺伝子

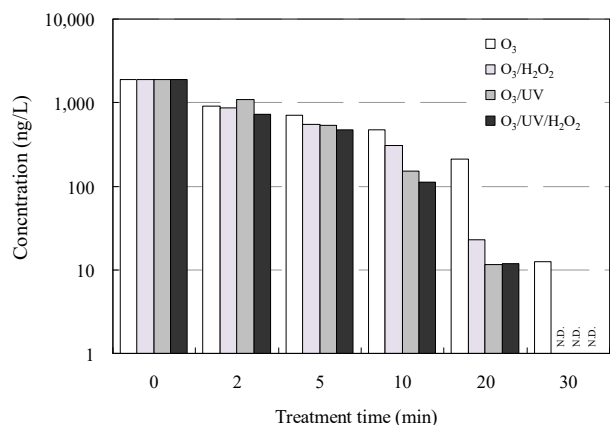


図 3 オゾン処理による抗菌薬濃度 (合計) の推移

これらの結果は、医療排水にオゾン処理を応用することにより、薬剤耐性菌や抗菌薬について効果的な不活化・除去を行うことが可能であることを示唆していると考えられる。本研究で得られた成果は、医療分野においてもオゾン処理が環境への配慮対策として有効な取り組みの1つとなる可能性を示唆していると考えられる。今後さらなる知見の収集を図るとともに、水環境中に流入する薬剤耐性菌や抗菌薬の環境リスク評価に関する研究とあわせて、環境面から薬剤耐性菌への新たな対策戦略についても発展を試みていくことが重要であると考えられる。

4. まとめ

本研究では、医療機関の排水を対象としてオゾン処理を応用し、薬剤耐性菌と抗菌薬への処理効果の評価を行った。その結果、薬剤耐性菌と抗菌薬はオゾン処理を行うことで速やかに不活化又は除去される傾向にあり、医療分野においてオゾン応用の有効性が示唆されることを明らかにした。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、採水にご協力賜りました病院関係者の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。本研究は、文部科学省科学研究費助成事業、農林水産省生産資材安全確保対策事業、厚生労働省科学研究費補助金研究事業、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 研究事業から一部助成を受けて実施しました。

参考文献

- 1) World Health Organization (WHO) (2014): Antimicrobial resistance: Global report on surveillance 2014. 1-232.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2019): Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. 1-139.
- 3) Murray, C.J.L., et al. (2022): Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
- 4) Jim, O.N. (2014): Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev. Antimicrob. Resist.*, 1-16.
- 5) World Health Organization (WHO) (2015): Global action plan on antimicrobial resistance. 1-19.
- 6) 内閣官房国際感染症対策調整室 (2016): 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン. 1-71.
- 7) Oliveira, T.S., et al. (2015): Characterization of pharmaceuticals and personal care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci. Total Environ.*, 518-519, 459-478.
- 8) He, H., et al. (2019): Degradation and deactivation of bacterial antibiotic resistance genes during exposure to free chlorine, monochloramine, chlorine dioxide, ozone, ultraviolet light, and hydroxyl radical. *Environ. Sci. Technol.*, 53(4), 2013-2026.
- 9) 厚生労働省, (2022): 薬事工業生産動態統計年報, Available from <<https://www.mhlw.go.jp/topics/yakuji/2021/nenpo/index.html>>.
- 10) Verlicchi, P., et al. (2015): What have we learned from worldwide experiences on the management and treatment of hospital effluent? — An overview and a discussion on perspectives. *Sci. Total Environ.*, 514, 467-491.
- 11) 日本下水道協会 (2022): 下水道統計. 日本下水道協会.
- 12) Perry, J.D. (2017): A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clin. Microbiol. Rev.*, 30(2), 449-480.
- 13) Lamba, M., et al. (2017): Hospital wastewater releases of carbapenem-resistance pathogens and genes in urban India. *Environ. Sci. Technol.*, 51(23), 13906-13912.
- 14) Gladys-Croue, J., et al. (2018): Survival of antibiotic resistant bacteria following artificial solar radiation of secondary wastewater effluent. *Sci. Total Environ.*, 626, 1005-1011.
- 15) Azuma, T., et al. (2019): Environmental fate of pharmaceutical compounds and antimicrobial-resistant bacteria in hospital effluents, and contributions to pollutant loads in the surface waters in Japan. *Sci. Total Environ.*, 657, 476-484.